

- I. 研究の動機と目的
- II. デジカメ簡易比色法について
 - 1) 材料と方法
 - 2) 分光光度計の原理と画像処理ソフトの色の扱い方について
 - 3) デジカメ簡易比色の測定結果と溶液の相関関係について
 - 4) デジカメ簡易比色の測定結果に及ぼす外的条件について
- III. デジカメ簡易比色法を利用した実験例
 - 1) スkimミルクを基質としたタンパク質分解酵素の活性の測定
 - 2) ヨウ素デンプン反応と簡易比色法を利用したデンプン水溶液の定量分析
- III. まとめ
- IV. 実践の様子
- V. 参考文献

I. 研究の動機と目的

[背景]

- ・プロテアーゼ活性の測定を行うためには、タンパク質の定量分析が欠かせない。
- ・タンパク質の定量は分光光度計などの機器を必要とするが、高価で繊細なため教育現場では用いられない。
- ・したがって、プロテアーゼ活性の測定実験は不可能で、代わりにカタラーゼなどの酵素が用いられるが、やはりその場合でも結果を見た目で判断したり、発生する泡の量などで反応速度を推測するにとどまる。
- ・既存の理科実験の方法では定量ができないため、生徒の発展的な考察が望めない。
- ・酵素の実験に限らず、教育現場では簡単に、短時間で、費用のかからない定量分析が望まれる。

[本研究のねらい]

- ・デジタルカメラと画像処理ソフトを使用して、呈色度合いから**簡便に短時間で定量する方法(以下、デジカメ簡易比色と省略)を考案する。**
- ・デジカメ簡易比色法による定量を活用し、酵素活性の測定実験を行い、**生徒の発展的な考察を目指す。**

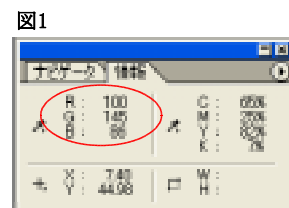
II. デジカメ簡易比色法について

1) 材料と方法

[準備するもの] ……**デジタルカメラ**(写真1), **画像処理ソフト**(写真2, Adobe Photoshopなど, スポイト機能必須), **パソコン**(画像処理ソフトが動作すれば良い)



- [方法] ①試料(試験管)をデジタルカメラで撮影し、画像をPCに取り込む。
- ②画像処理ソフトで画像を読み込み、スポイト機能を使用して溶液の色のデータ(図1, 情報ウィンドウ)を取得する。取得位置は、試験管の厚みのある中央付近のランダムに選んだ3点とし、その平均値を測定値とする。
- ③測定値から検量線をもとに濃度を算定する。



2) 分光光度計の原理と画像処理ソフトの色の扱い方について

- ・ある特定の波長を試料に照射し、透過する割合から試料の濃度を求める方法を**分光計測**という。

- ・コンピュータは、R (赤) G (緑) B (青) を組み合わせた**RGB方式**で他種類の色を再現している。
- ・デジカメも概ねコンピュータと同様の表示形式で、撮影した画像からスポイト機能で取得したRGBのデータは、それぞれ被写体 (試料) から反射した**700nm, 546.1nm, 435.8nm**の測定値ということになる。

3) デジカメ簡易比色の測定結果と溶液の相関関係について

- ・デジカメ簡易比色の原理は分光光度計と異なる。しかし、**デジカメ簡易比色法の測定結果と濃度に明確な相関関係があれば濃度を算出することは可能**である。
- ・相関関係を証明するために、タンパク質 (BSA:牛血清アルブミン) を**Lowry法** (参考文献3 (写真3)) によって呈色させて分光光度計で測定するとともに、同一試料をデジカメ簡易比色法で測定し、それぞれ検量線を作成した (図2, 図3)。

写真3



[結果]

- ・デジカメ簡易比色の測定値と濃度に、**二次曲線で表せる相関関係を確認した** (図3)。
- ・Lowry法は500~750nmで測定する。デジカメ簡易比色でもR値(750nm)の感度が高い。

図2

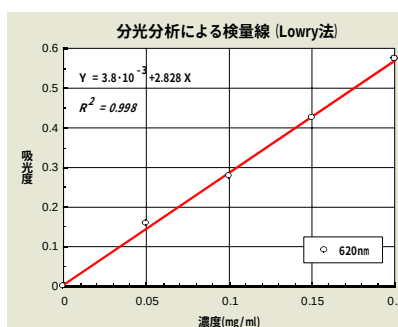
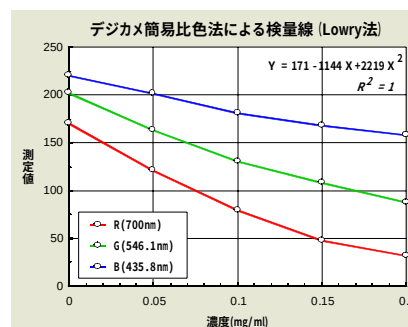


図3



4) デジカメ簡易比色の測定結果に及ぼす外的条件について

- ・デジカメ簡易比色による計測データは、カメラの設定や撮影環境によって変化する。
- ・カメラの設定 (感度及び露出) を変え、また、誤差を少なくするためにライトボックスを作成し、同一試料をさまざまな条件で撮影し、測定データを比較検討した。

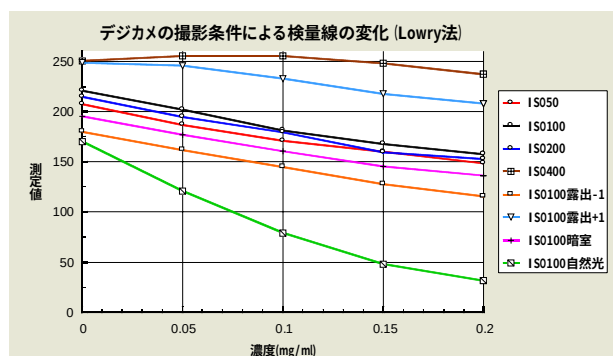
[ライトボックスの作成]

- ・四角形のカラーボックスに電球を取り付け、乳白色のアクリル板を設置 (写真4)。
- ・試験管を円形状に並べることで位置による誤差を少なくできる。

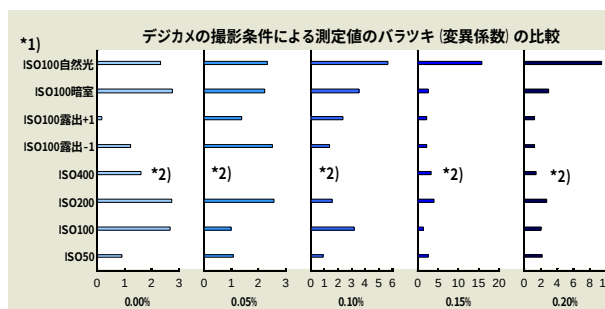
写真4 ライトボックス



[撮影条件 (ISO, 露出, 光源) を変えて作成した検量線及び変異係数の比較]



左: 図4 下: 図5



*1) 「ISO100自然光」はライトボックスを未使用で、曇りガラスから入射する自然光 *2) 測定値が限界を表示

- ・ライトボックスを使用すると誤差を少なくできる。
- ・今回の実験では、カメラはISO100、露出はそのままか、あるいはマイナスにするのが好ましい。
- ・授業時間内に実験することを考慮すると、あえて暗室にして手間をかける必要はない。

III. デジカメ簡易比色法を利用した実験例

1) スキムミルクを基質としたタンパク質分解酵素の活性 (プロテアーゼ活性) の測定

〔目的〕 『酵素濃度と反応速度の関係』及び『最適温度』を測定する。

〔材料〕 酵素: **コンタクトレンズ用タンパク質分解酵素**「マルチワンドロップ, 旭化成」

基質: **スキムミルク** (脱脂粉乳)

写真5

〔実験の原理〕

- ・スキムミルクを水に溶かすと**白濁**する。この主な原因はスキムミルクに含まれる**カゼインミセル**である(参考文献4)。
- ・スキムミルク水溶液にコンタクトレンズ用の分解酵素を加えるとカゼインが分解されて**透明**になる(写真5, 経過時間順に整列。一番右は蒸留水)。
- ・**透明度から濃度を算出する**。なお、試料が白く、ライトボックスを使用すると差が見つけにくくなるため、黒い画用紙を敷いて自然光の下で撮影した。

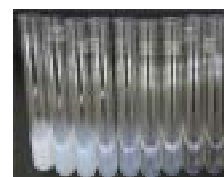
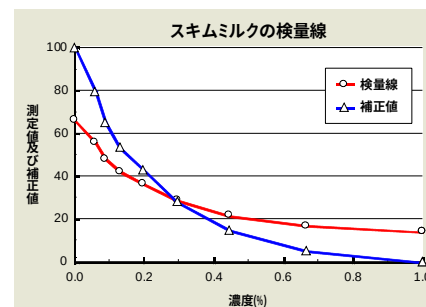


図6

〔検量線の作成〕

- ・分解によって白色から透明という変化のため、画像を白黒画像にしてからデータを取得した。
- ・検量線としては不適だが、二次曲線の相関関係がある(図6の赤線)。
- ・「1.0%」「0%」の測定値をそれぞれ0, 100とし、0~100スケールのグラフに補正した(図6の青線)。



〔結果〕

『酵素濃度と反応速度の関係』について

- ・酵素濃度を変えて3分まで反応させ、それぞれ1分ごとの測定値を求めた(図7)。
- ・測定値を補正し(図8)、補正值の検量線から濃度を算出し、反応2分後のタンパク質分解量を求めた(表1)。
- ・酵素原液の粘度や容器(市販の酵素液の容器と希釈液の容器が異なる)によって1滴の重さが異なるため、添加する酵素1滴の重さを測定した(図9)。
- ・添加する酵素液の濃度や量から、25%酵素液添加区を基準として理想的な分解比率を算出した(表1)。
- ・**理想の分解比率と実際の分解比率を比較すると、理論値に近い結果もあるが異なる結果もあった。**

図7

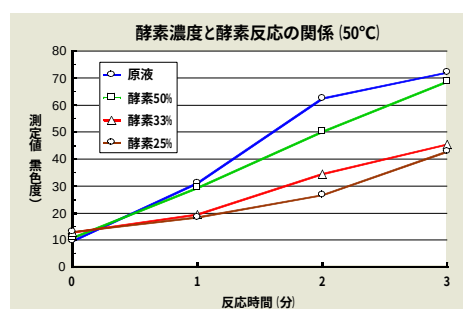


図8

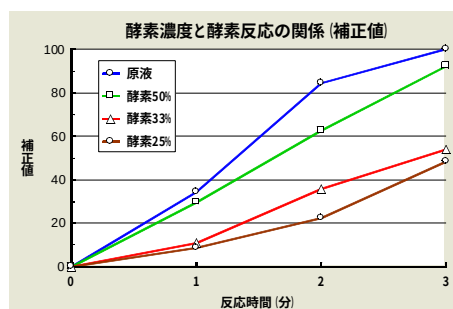


図9

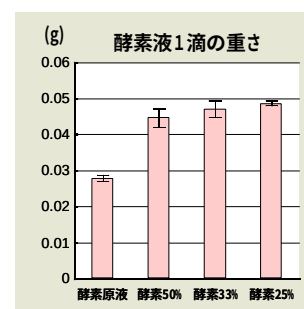


表1 反応2分後の酵素濃度と反応速度の関係

*)25%酵素液区に対しての割合

	反応後の濃度(%)	基質分解量(mg)	酵素添加量比率	実際の分解量比率*)	理想の分解量比率*)
100%酵素液	0.0430	28.71	0.57	1.69	2.30
50%酵素液	0.0920	27.24	0.92	1.60	1.84
33%酵素液	0.2460	22.62	0.97	1.33	1.28
25%酵素液	0.4340	16.98	1.00	1.00	1.00

『最適温度』について

- ・温度を変えて1分ごとの経時変化を測定し(図10)、補正グラフを作成した(図11)。
- ・図11から、反応2分後における最適温度のグラフを作成した(図12)。
- ・使用した酵素の最適温度は70℃前後という高温だった。
- ・発売元(旭化成アイミー)に確認したところ、概ねその通りという回答で、**実験は理論通りの結果を得た。**

図 10

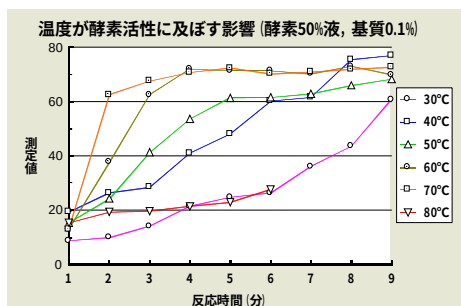


図 11

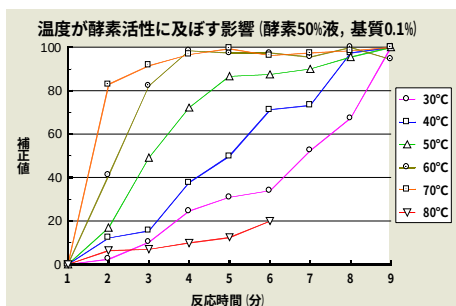
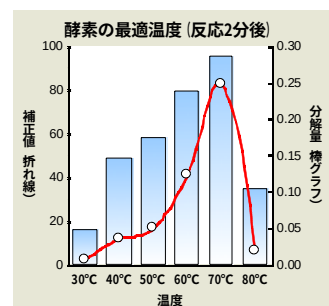


図 12



[補足実験]

- ・上記の実験では『濁度』を指標としている。化学の授業で学習する「ビューレット反応」や「ニンヒドリン反応」を利用できないか検討した。
- ・写真6はビューレット反応による呈色である。スキムミルクを溶質として左から「1.0%」「0.6%」「0.2%」、さらに「蒸留水」「酵素(添加量1滴)添加」と並んでいる。プロテアーゼもタンパク質として反応してしまうことや、呈色は数分経たないと安定しないことなどを除けば授業での利用も可能である。
- ・写真7は、左から酵素反応「0分」「1分」・・・「4分」、蒸留水で、ニンヒドリン反応によって呈色させたものである。はじめからスキムミルク中に十分なアミノ酸が存在するため、酵素活性の経時変化は観察できない。
- ・タンパク質が分解されていることをSDS-PAGEで確認した(写真8)。写真左から「マーカー」, 「酵素」, 「スキムミルク+酵素(酵素反応物)」, 「スキムミルク」。試料である「スキムミルク」と「酵素反応物」の基質濃度はほぼ同じことから、「酵素反応物」にバンドが見あたらないのは酵素によってカゼインが分解されたためと考えられる。
- ・カゼインは酸、塩基によって濁度が変わってしまうため、最適pHの測定はできなかった。

写真 6



写真 7

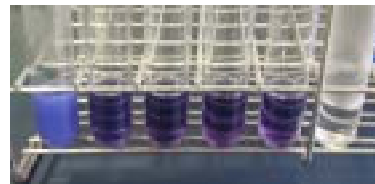


写真 8



2) ヨウ素デンプン反応と簡易比色法を利用したデンプン水溶液の定量分析

[目的] ヨウ素デンプン反応と簡易比色法を利用してデンプン水溶液の濃度を調べる。

[検量線の作成]

- ・検量線としては好ましくないが、二次曲線の相関関係が見られ、G値(緑)の感度が最もよい(図13)。
- ・測定値から補正值のグラフを作り(図14)、検量する。
- ・定量できる適正濃度は0%~0.08%付近である。

図 13

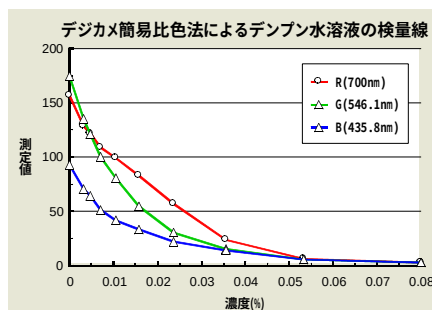
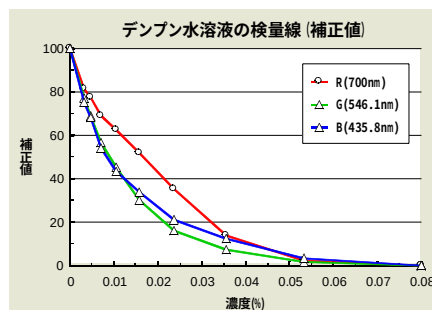


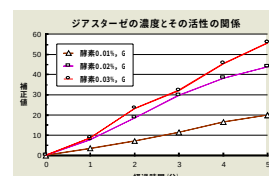
図 14



[補足実験]

- ・上記のような定量分析を応用して酵素(ジアスターゼ)活性を測定し(図15)、検量線をもとに基質濃度を算出し、酵素濃度と反応速度の関係を調べたが、理想通りの関係が見られなかった。
- ・理由に、ヨウ素デンプン反応が温度や様々な物質の影響を受けやすいことが考えられる。

図 15



- ・特に、酵素とヨウ素ヨウ化カリウム溶液の添加する順番を変えるだけで分解能力に大きな差があることや、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液と酵素の混合物に沈殿が生じることなどから、ジアスターゼとの相互作用 (特に酵素活性を阻害する可能性) が大きく、酵素活性を測定することは困難であると考えた。

III. まとめ

- ・デジカメ簡易比色による定量は、分光光度計には及ばないが、十分に定量できる精度で、簡便、短時間、安価である。
- ・今回使用した画像処理ソフトは比較的高価であるが、フリーソフト (GIMP, Dibas^{参考文献5}) などでも可能なことを確認した) を利用すれば費用を抑えられる。
- ・コンタクトレンズ用タンパク質分解酵素とスキムミルクを使った酵素活性の測定実験は、材料の調達が容易で、危険な薬品を使用せず、結果も概ね良好であった。
- ・ヨウ素デンプン反応を利用した定量分析は十分可能であったが、この反応はさまざまな影響を受けやすいため、酵素活性の測定は困難である。
- ・本研究では、デジカメ簡易比色法の有用性を示すために定量実験や酵素活性の測定実験を紹介したが、その他の分野でも定量が可能であると感じた。この方法は測定したい色を撮影するだけなので、検量線さえ作成できれば色や曇りのある気体、色の付いた水などの固体でも定量分析が可能である。

IV. 実践の様子



☆授業展開における留意点

- ・生徒のデータ処理が単なる計算にならないように、計算の目的をよく理解させた。
- ・生徒が考察し易いように、考察の記述に生徒自身が重要と思ったキーワードをいくつか答えさせた。
- ・教科書の内容と今回の実験結果の中で一部異なる結果があることを指摘し、生徒が教科書をよく読み返す配慮をした。
- ・各班の実験条件 (温度や酵素濃度) を変えることにより、生徒に責任感を持たせ実験意欲を高めた。ただし、それがマイナスのプレッシャーにならないように留意した。
- ・『なぜデジカメ簡易比色法を利用して実験を行うか』という実験の意義を入念に説明し、理解させた。
- ・酵素の説明もさることながら、基質 (スキムミルク) の説明を十分に行った。特に基質が白濁するメカニズムについてよく説明した。
- ・プリントや授業中はできるだけ質問を多くし、生徒に考えさせた。
- ・実験前に、酵素活性を調べるために必要な道具や実験の方法を生徒に計画させ、実験の目的を認識させた。
- ・実験の目的は、酵素がどれくらいの基質を分解したかという単純なものであるが、高校生には「検量線」という概念が無いため、この説明を十分にする必要があった。

☆『カゼインを基質としたプロテアーゼ活性の測定実験』の生徒のアンケートから

生徒の関心	・栄養士を目指している私にとっては、酵素の働きに関する講義や実験はとても勉強になりました。普段の授業では出来ない内容だったので良かったです。
理解度	・今まで酵素について深く考えたことはなかった。でも講義で勉強していった実際に実験してみたいと思った。 ・実験をする前に実験の意味などを詳しく説明してくれたので、とても理解しやすかったです。 ・実験は、比較するものの条件を同じにすることが大切だとわかった。
科学的な 考え方や 考察力	・話を聞いただけではわからないけど、自分たちで実験をし、グラフにまとめたりしたのでわかりやすかった。 ・実験前に最適温度を調べる方法を考えたときに、先生の答え(実験方法)と大体合っていたので、(実験の考え方が)できていたのかな…と思う。
自発性	・結果を見てみると、自分が思っていた結果とは違ったりしていて、実験ではこうなることもあるんだと思った。(今回の実験で、酵素濃度が2倍になり反応速度が約2.5倍という結果、のためと思う) ・どのようにして調べることが出来るかなど、自分で実験の方法を考えたりするのは難しかったです。
数学的思考	・とても楽しく、わかりやすかったため、自分から「もっと知りたい」と思うことが出来ました。今日の実験では積極的に取り組めた。 ・パソコンを使い、デジカメで撮った写真でどれくらいの濃度か調べられるということが、数学を使うことによって求められるなんてすごいと思いました。 ・補正値の求め方のときに、どうすれば0～100スケールのグラフになるのかわかったけど、自分で数式を出せなかったのが悔しかった。
共同作業に おける協調性	・計算式を使って結果をだすことが出来ることに驚きました。 ・みんなで協力して一つの表を完成し、色々な結果がでて面白かった。
その他	・みんなで分担して実験をしたのでやりやすかった。わからないところは、友達に聞いたり、実験を手伝ってもらったりして楽しく実験が出来たと思う。友達の意見なども聞けたので良かった。 ・栄養の授業とかで消化酵素についてはやったけど、酵素にはまだまだいろいろな(性質など)があると思った。全部調べるのは大変だけど、面白そうだと思います。また、チンダル現象なども知ることが出来て勉強になりました。

☆最後に

- ・この実験では他の理科実験よりも操作手際の善し悪しが測定結果に大きく影響する。さらに実験の道具や指導方法を工夫し、誤差が出にくい実験様式を模索する必要がある。
- ・生徒が実験の目的をよく理解していたこともあるが、既存の酵素実験よりも酵素の特性を理解した内容の濃い考察が多々見受けられた。
- ・特に酵素濃度と反応速度の関係や最適温度などについて、数字を交えて考察していたことはこの実験の意図しているところであり、有意義な実験であったと感じた。

V. 参考文献

- 1) 原書23版 ハーパー・生化学 丸善株式会社
- 2) 日本薬局法(一般試験法)
- 3) 新生化学実験講座1タンパク質 I 日本生化学会編
- 4) ミルク総合辞典 朝倉書店
- 5) GIMP (<http://www.gimp.org>) ,Dibas (<http://www.vector.co.jp/>にて配布)